

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING OLIGOSACCHARIDES AND PREPARATION THEREOF

Publication number: FR2807043

Publication date: 2001-10-05

Inventor: MOURIER PIERRE; PERRIN ELISABETH; VISKOV CHRISTIAN

Applicant: AVENTIS PHARMA SA (FR)

Classification:






- international: A61K31/70; A61K31/7032; A61K31/715; A61K31/737; A61P9/10; A61P17/02; A61P19/02; A61P25/00; A61P25/02; A61P25/14; A61P25/16; A61P25/28; A61P29/00; C07H1/00; C07H15/04; C08B37/00; C08B37/10; A61K31/70; A61K31/7028; A61K31/715; A61K31/737; A61P9/00; A61P17/00; A61P19/00; A61P25/00; A61P29/00; C07H1/00; C07H15/00; C08B37/00; (IPC1-7): C07H13/12; A61K31/737; A61P9/00; A61P25/00; A61P31/00

- European: A61K31/70; C07H1/00; C07H15/04D2; C08B37/00P2G2

Application number: FR20000003910 20000328

Priority number(s): FR20000003910 20000328

Also published as:

 WO0172762 (A1)
 MXPA02009455 (A)
 EP1272499 (A0)
 EE200200551 (A)
 CA2403906 (A1)

more >>

Report a data error here

Abstract of FR2807043

The invention concerns pharmaceutical compositions containing as active principle an oligosaccharide or formula (I) or a mixture of said oligosaccharides, novel oligosaccharides of formula (I), mixtures thereof and methods for preparing them.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

11 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 807 043

21 N° d'enregistrement national : 00 03910

51 Int Cl⁷ : C 07 H 13/12, A 61 K 31/737, A 61 P 9/00, 25/00, 31/00

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 28.03.00.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la demande : 05.10.01 Bulletin 01/40.

56 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

71 Demandeur(s) : AVENTIS PHARMA S.A. Société anonyme — FR.

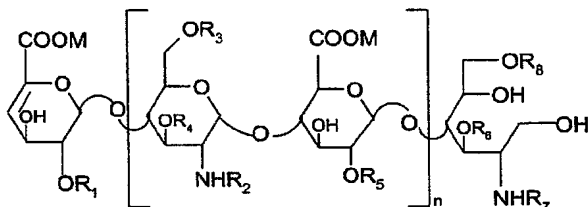
72 Inventeur(s) : MOURIER PIERRE, PERRIN ELISABETH et VISKOV CHRISTIAN.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) :

54 COMPOSITION PHARMACEUTIQUE CONTENANT DES OLIGOSACCHARIDES, LES NOUVEAUX OLIGOSACCHARIDES ET LEUR PREPARATION.

57 La présente invention concerne les compositions pharmaceutiques contenant en tant que principe actif un oligosaccharide de formule :



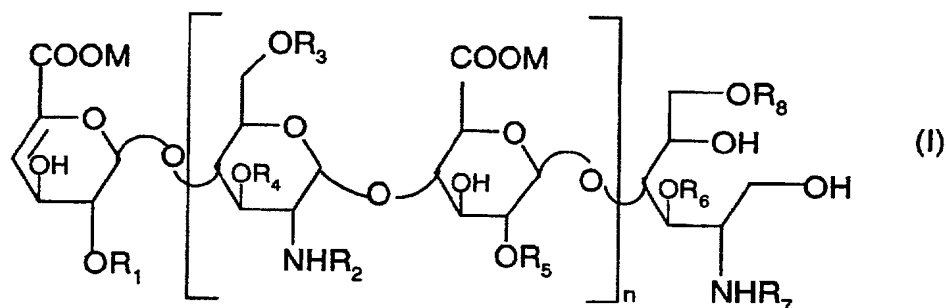
ou un mélange de ces oligosaccharides, les nouveaux oligosaccharides de formule (I), leurs mélanges et leurs procédés de préparation.

FR 2 807 043 - A1



COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES CONTENANT DES
OLIGOSACCHARIDES, LES NOUVEAUX OLIGOSACCHARIDES
ET LEUR PREPARATION

La présente invention concerne les compositions pharmaceutiques contenant en tant
5 que principe actif un oligosaccharide de formule :



ou un mélange de ces oligosaccharides, les nouveaux oligosaccharides de formule (I),
leurs mélanges et leurs procédés de préparation.

Dans la formule (I) n est un entier de 0 à 25, R_1 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et R_8 , identiques ou
10 différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M , R_2 et R_7 ,
identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M ou
 $COCH_3$ et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium.

Ces oligosaccharides comportent ainsi un nombre pair de saccharides.

Dans la formule (I) R_4 et R_6 sont, de préférence, des atomes d'hydrogène.

15 Des oligosaccharides de formule (I) pour lesquels n est égal à 0, et soit R_1 , R_6 et R_8
représentent un atome d'hydrogène, R_7 représente un radical SO_3M ou $COCH_3$ et M
est sodium, soit R_1 et R_6 représentent un atome d'hydrogène, R_7 représente un radical
 $COCH_3$, R_8 représente un radical SO_3M et M est sodium, soit R_6 représente un atome
d'hydrogène, R_1 , R_7 et R_8 représentent un radical SO_3M et M est sodium ont déjà été

décrits par G.H. LEE et coll., J. Chromat. 212, 65-73 (1981) mais aucune propriété pharmacologique n'est décrite pour ces produits.

Les compositions pharmaceutiques préférées sont celles contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel :

- 5 - n est un entier de 0 à 10 et, en particulier de 0 à 6 et encore plus particulièrement de 1 à 6.

- $R_1, R_2, R_3, R_5, R_7, R_8$ sont identiques ou différents et représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M et, en particulier $R_1, R_2, R_3, R_5, R_7, R_8$ sont des radicaux SO_3M ,

- 10 - M est sodium.

Les compositions pharmaceutiques particulièrement préférées sont celles contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel :

- n est égal à 0, R_1, R_7 et R_8 représentent un radical SO_3M , R_6 représente un atome d'hydrogène et M est sodium,

- 15 - n est égal à 1, R_1, R_2, R_3, R_5, R_7 et R_8 , représentent un radical SO_3M , R_4 et R_6 représentent un atome d'hydrogène et M est sodium,

- n est égal à 2, R_1, R_2, R_3, R_5, R_7 et R_8 , représentent un radical SO_3M , R_4 et R_6 représentent un atome d'hydrogène et M est sodium,

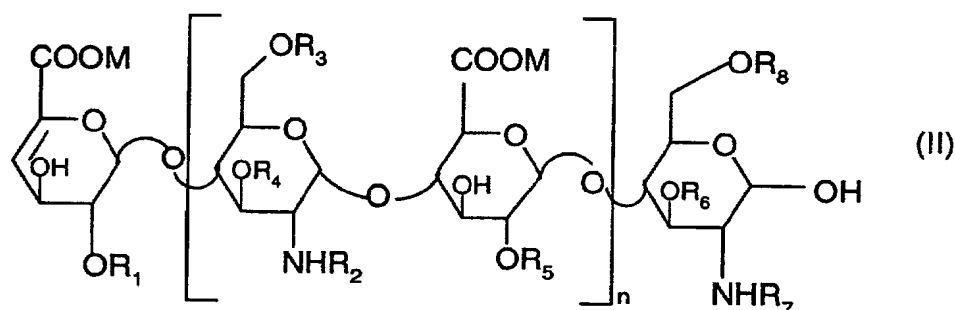
- 20 - n est égal à 3, R_1, R_2, R_3, R_5, R_7 et R_8 , représentent un radical SO_3M , R_4 et R_6 représentent un atome d'hydrogène et M est sodium,

- n est égal à 4, R_1, R_2, R_3, R_5, R_7 et R_8 , représentent un radical SO_3M , R_4 et R_6 représentent un atome d'hydrogène et M est sodium.

Les oligosaccharides de formule (I) à l'exception de ceux pour lesquels n est égal à 0 et soit R_1, R_6 et R_8 représentent un atome d'hydrogène, R_7 représente un radical

SO_3M ou COCH_3 et M est sodium, soit R_1 et R_6 représentent un atome d'hydrogène, R_7 représente un radical COCH_3 , R_8 représente un radical SO_3M et M est sodium, soit R_6 représente un hydrogène, R_1 , R_7 et R_8 représentent un radical SO_3M et M est sodium sont nouveaux et en tant que tels font partie de l'invention.

- 5 Les oligosaccharides de formule (I) peuvent être préparés par action d'un borohydrure de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire sur des oligosaccharides de formule :



- dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R_1 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et R_8 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M , R_2 et R_7 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M ou COCH_3 et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium.

- Cette réaction s'effectue en milieu aqueux, à une température voisine de 25°C , à un pH compris entre 7 et 10 et de préférence entre 9 et 10, pendant toute la durée de la réaction. Le maintien du pH est obtenu par addition d'une solution de soude à 0,5 mol/l. La réaction est arrêtée par acidification du milieu réactionnel, par exemple par addition d'acide acétique jusqu'à obtention d'un pH compris entre 4 et 5.

Comme borohydrure de métal alcalin, on peut citer le borohydrure de lithium, de sodium et de potassium.

- Comme borohydrure d'ammonium quaternaire, on peut citer le borohydrure de tétrabutylammonium.

Les oligosaccharides de formule (II) peuvent être obtenus par séparation par chromatographie sur gel d'un mélange d'oligosaccharides (III) obtenu par dépolymérisation enzymatique de l'héparine ou dépolymérisation basique de l'ester benzylique de l'héparine ou d'un ester benzylique d'héparine d'hémisynthèse.

- 5 Cette chromatographie s'effectue sur des colonnes remplies de gel de type polyacrylamide-agarose tel que celui commercialisé sous la marque Ultrogel ACA202^R (Biosepra). De préférence, on utilise une batterie de colonnes de gel polyacrylamide agarose. Le nombre de colonnes utilisées est adapté en fonction du volume, du gel et des oligosaccharides à séparer. Le mélange est élué par une solution
10 contenant un tampon phosphate et du chlorure de sodium. De préférence, la solution tampon phosphate est une solution à 0,02 mol/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7) contenant 0,1 mol/l de chlorure de sodium. La détection des différentes fractions est réalisée par spectrométrie UV (254 nm) et ionique (IBF). Les fractions ainsi obtenues peuvent ensuite être éventuellement purifiées par exemple par chromatographie SAX
15 (strong anion exchange) selon les méthodes connues de l'homme du métier et notamment selon les méthodes décrites par K.G. Rice et R.J Linhardt, Carbohydrate Research 190, 219-233 (1989), A. Larnkjaer, S.H. Hansen et P.B. Ostergaard, Carbohydrate Research, 266, 37-52 (1995) et dans le brevet WO90/01501 (exemple 2). Les fractions sont ensuite lyophilisées puis désalées sur une colonne remplie de
20 gel telle qu'une colonne de gel Séphadex G10^R (Pharmacia Biochemicals).

Lorsque la purification n'est pas réalisée par chromatographie SAX, les lyophilisats peuvent être éventuellement purifiés par précipitation simple ou fractionnée selon les méthodes connues de l'homme du métier et notamment selon la méthode décrite dans le brevet FR2548672. De façon générale, on opère selon le protocole suivant :

- 25 La fraction lyophilisée à purifier est dissoute à 25°C dans environ dix volumes d'eau distillée. Par ajout de méthanol ou d'éthanol, on fait précipiter l'oligosaccharide désiré en contrôlant son enrichissement par chromatographie CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance). L'ajout de méthanol ou d'éthanol est

déterminé en fonction de la pureté et du rendement désiré du dit oligosaccharide. De même, cette opération peut être réalisée en plusieurs étapes successives à partir de la solution initiale de lyophilisat. Pour cela, on rajoute l'agent insolubilisant (méthanol ou éthanol) par petites portions et on isole après chaque ajout le précipité obtenu. Les précipités ainsi préparés sont analysés par chromatographie CLHP. Selon la pureté et le rendement désiré, on rassemble les fractions adéquates de précipité.

- Selon une variante de la présente invention, la fraction lyophilisée à purifier peut être dissoute dans 10 à 200 volumes d'eau contenant de 0 à 30% d'acétate de sodium. Le pourcentage d'acétate de sodium sera ajusté au préalable en fonction de la nature de l'oligosaccharide à traiter (fonction de la taille). Par ajout de méthanol, on fait précipiter l'oligosaccharide désiré en contrôlant son enrichissement par chromatographie CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance). L'ajout de méthanol est déterminé en fonction de la pureté et du rendement désiré du dit oligosaccharide. De même, cette opération peut être réalisée en plusieurs étapes successives à partir de la solution initiale de lyophilisat. Pour cela, on rajoute l'agent insolubilisant (méthanol) par petites portions et on isole après chaque ajout le précipité obtenu. Les précipités ainsi préparés sont analysés par chromatographie CLHP. Selon la pureté et le rendement désiré, on rassemble les fractions adéquates de précipité.
- Pour les intermédiaires de formule (II) pour lesquels $n = 0, 1$ ou 2 , il est préférable de partir d'un mélange (III) obtenu par dépolymérisation enzymatique.

Cette dépolymérisation s'effectue au moyen d'héparinase I (EC 4.2.2.7), au sein d'une solution tampon phosphate de pH7, en présence de chlorure de sodium et de BSA (Albumine de Sérum Bovin), à une température comprise entre 10 et 18°C et, de préférence 15°C, pendant 8 à 10 jours et, de préférence, 9 jours. La dépolymérisation est arrêtée par exemple par chauffage du milieu réactionnel à 100°C pendant 2 minutes et le mélange est récupéré par lyophilisation. Il est préférable d'utiliser 7 UI d'héparinase I pour 25 g d'héparine. La solution tampon phosphate comprend

généralement 0,05 mol/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7) en présence de 0,1 mol/l de chlorure de sodium. La concentration en BSA est généralement de 2%.

- Pour les intermédiaires de formule (II) pour lesquels $n = 0, 1, 2, 3$ ou 4, il est préférable de partir d'un mélange (III) obtenu par dépolymérisation d'un ester benzylique de l'héparine.
- 5

L'ester benzylique de l'héparine peut être préparé selon les méthodes décrites dans les brevets US5389618, EP40144, FR2548672. Le taux d'estérification sera de préférence compris entre 50 et 100 %. De façon préférentielle, il sera compris entre 70 et 90%.

- 10 La dépolymérisation s'effectue en milieu aqueux, au moyen d'un hydroxyde de métal alcalin (hydroxyde de lithium, soude, potasse ou hydroxyde de césium par exemple) ou d'un hydroxyde d'ammonium quaternaire (hydroxyde de tétrabutylammonium par exemple), de préférence, à une molarité comprise entre 0,1 et 0,2 mol/l, à une température comprise entre 40 et 80°C, pendant 5 à 120 minutes. Dans un mode
- 15 préféré, on opère pendant 5 à 15 minutes, à une température comprise entre 60 et 70°C, avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,15 mol/l. La réaction de dépolymérisation est arrêtée par neutralisation par addition d'un acide tel que l'acide acétique. Après addition de 10% en poids par volume d'acétate de sodium, le mélange d'oligosaccharides est précipité par addition de méthanol, de préférence, 2 volumes
- 20 pour 1 volume de milieu réactionnel et filtré.

- Selon un aspect préféré de l'invention, le mélange d'oligosaccharides obtenu après dépolymérisation chimique, sous forme d'une solution aqueuse, est enrichi par ultrafiltration sur membranes avec un seuil de coupure nominal approprié (type Pellicon en cellulose régénérée commercialisées par Millipore); le type de membrane
- 25 étant adapté en fonction du type d'oligosaccharides enrichis à récupérer. Pour les oligosaccharides (II) pour lesquels $n = 0$, on utilisera une membrane de seuil de coupure nominal de 1 kDa, pour les oligosaccharides (II) pour lesquels $n = 1$, on utilisera une membrane 1 kDa ou 3 kDa, pour les oligosaccharides (II) pour lesquels

n = 2, on utilisera une membrane 3 kDa, pour les oligosaccharides (II) pour lesquels n = 3 ou 4, on utilisera une membrane 5 kDa. Au cours de cette opération, le perméat est récupéré et le rétentat rejeté. Ainsi, la fraction de produit enrichi peut représenter de 50 à 10% du mélange d'oligosaccharides initial tout en conservant au moins 80% de l'oligosaccharide désiré.

Pour les intermédiaires de formule (II) pour lesquels n = 0 à 25, il est préférable de partir d'un mélange (III) obtenu par dépolymérisation d'un ester benzylique de polysaccharide sulfaté d'hémisynthèse. L'ester benzylique de polysaccharide sulfaté d'hémisynthèse est préparé à partir de polysaccharides sulfatés d'hémisynthèse obtenus à partir du polysaccharide K5 et selon les méthodes décrites dans les brevets WO94/29352 et WO96/14425. Les conditions d'estérification, de dépolymérisation et de récupération sont les mêmes que celles décrites précédemment pour l'ester benzylique d'héparine.

Dans tous les procédés précédents, l'héparine initiale peut être d'origine porcine, ovine, caprine ou bovine et peut provenir des mucus, poumons ou peaux des animaux. De préférence, on utilise une héparine de mucus porcin, ovin ou de poumons de boeuf et encore plus préférentiellement de mucus porcin ou de poumon de boeuf.

Les oligosaccharides de formule (I) présentent des propriétés anti-inflammatoires et peuvent ainsi être utilisées pour la prévention ou le traitement de maladies liées à un processus inflammatoire impliquant la production de substances cytotoxiques telle que le monoxyde d'azote (NO) dont la forme inductible est libérée notamment par les neutrophiles ou les macrophages lorsque ceux-ci migrent et sont activés au niveau d'un tissu. La migration, l'activation et l'adhésion des neutrophiles se produit au niveau des zones tissulaires ischémiées à la suite d'une occlusion ou d'un spasme d'une artère vascularisant ce tissu. Ces ischémies peuvent se produire soit au niveau cérébral (accident vasculaire cérébral), soit au niveau du myocarde (infarctus du myocarde), soit au niveau des membres inférieurs (ischémies dites périphériques). Les oligosaccharides de formule (I) peuvent ainsi être utilisées pour la prévention et/ou le

- traitement des maladies neurodégénératives pour lesquelles l'inflammation cérébrale joue un rôle délétère pouvant conduire à la mort parmi lesquelles on peut citer les ischémies cérébrales, les ischémies cardiaques (infarctus du myocarde), les ischémies périphériques, les traumatismes du système nerveux central et notamment les
- 5 traumatismes crâniens, spinaux et crânio-spinaux, la sclérose en plaques, les douleurs neuropathiques et les neuropathies périphériques, les maladies du motoneurone dont la sclérose latérale amyotrophique, le neuro-sida, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la Chorée de Huntington et certaines formes d'ostéoarthrites notamment à localisation articulaire.
- 10 L'activité anti-inflammatoire de ces produits est démontrée in vivo dans le test de production de NOx (nitrite et nitrate) induite par un lipopolysaccharide (LPS) provenant d'E. Coli selon le protocole décrit par M. YAMASHITA et coll., Eur. J. Pharmacol, 338, 2, 151-158 (1997) ou J.E. SHELLITO et coll. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 13, 1, 45-53 (1995).
- 15 On injecte, à des souris CD1 mâles (Charles River, 25-35g), à T0 par voie intraveineuse bolus 0,5 mg/kg de l'oligosaccharide, à T+15 minutes, par voie sous-cutanée 1 ou 2 mg/kg de l'oligosaccharide. A T+30 minutes, on administre 100 mg/kg de lipopolysaccharide (LPS) provenant d'E. Coli (Sigma L3129, sérotype 0127:B8). A T+3 heures on injecte à nouveau par voie sous-cutanée 1 ou 2 mg/kg de
- 20 l'oligosaccharide. A T+5 heures 30 minutes, un échantillon de sang est récupéré par ponction à l'oeil et les concentrations en NOx (nitrite et nitrate) dans le plasma sont déterminées avec la méthode colorimétrique de Griess après réduction du nitrate en nitrite par nitrate réductase de la manière suivante : 12 ml de l'échantillon de plasma sont mélangés avec 88 ml d'eau déionisée et incubés dans le noir 1 heure à
- 25 température ambiante avec 40 ml de tampon phosphate (0,31M, pH 7,5), 20 ml de β -NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit) (0,86mM), 20 ml de FDA (flavine adénine dinucléotide) (0,11 mM) et 20 ml de nitrate réductase (2U/ml) (Boehringer Mannheim). 10 ml de $ZnSO_4$ (1M) sont ajoutés pour précipiter les protéines et après mélange, les échantillons sont centrifugés à 20 000g pendant 5

minutes. Finalement, 50 ml du supernageant sont incubés 10 minutes à température ambiante avec 100 ml du réactif de Griess (sulfanilamide à 1 % dans un mélange acide phosphorique/naphtyéthylènediamine 0,1% dans l'eau déionisée (V/V)). Les densités optiques sont lues à 540 nm avec un spectrophotomètre microplaques; chaque point étant déterminé 2 fois. KNO₃ et NaNO₂ sont utilisés comme standard pour la méthode colorimétrique.

Dans ce test, les oligosaccharides selon l'invention inhibent à plus de 50 % la formation de NOx.

Les exemples suivants sont représentatifs de la préparation des oligosaccharides de formule (I) et des intermédiaires.

Dans ces exemples les significations des abréviations sont les suivantes :

DIs : (acide 4-déoxy-2-*O*-sulfo- α -L-thréo-hex-enopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfo- α -D-glucopyranose, sel de tétrasodium ou bien DUAp2S-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp2S6S

15 Is : (acide 2-sulfo- α -L-idopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfo- α -D-glucopyranose, sel de tétrasodium (acide 2-sulfo- α -L-idopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranose, sel de tétrasodium ou bien α -L-IdoAp2S- (1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp2S6S

20 IIs : (acide α -L-idopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino - α -D-glucopyranose, sel de trisodium ou bien α -L-IdoAp- (1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp2S6S

IIIs : (acide 2-sulfo- α -L-idopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-sulfoamino- α -D-glucopyranose, sel de trisodium ou bien α -L-IdoAp2S- (1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp2S

IdoAp : acide idopyranosyluronique

GlcNp : 2-amino-2-déoxy-glucopyranose

DUap : acide 4-déoxy- α -L-thréo-hex-enopyranosyluronique

S : sulfate.

EXEMPLES DE PREPARATION DES MELANGES INTERMEDIAIRES DE FORMULE (II)

- 5 EXEMPLE A - préparation des oligosaccharides de formule (II) pour lesquels $n = 0, 1$ et 2 par dépolymérisation enzymatique et séparation

Dissoudre 25 g d'héparine dans 250 ml d'une solution tampon phosphate contenant 0,05 mol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ($\text{pH} = 7$), 0,2 mol/l de chlorure de sodium et 2 % de BSA (Albumine de Sérum Bovin). On introduit dans le mélange 7 UI d'héparinase I
10 (EC 4.2.2.2.7) et la solution obtenue est refroidie à 15°C puis maintenue à cette température pendant toute la durée de la réaction de dépolymérisation. L'avancement de la réaction est suivie par des prélèvements échelonnés d'aliquotes et analysés par chromatographie sur perméation de gel. Au bout de 9 jours, la réaction enzymatique est arrêtée en chauffant le milieu réactionnel à 100°C pendant deux minutes. Le
15 mélange refroidi est ensuite lyophilisé. On obtient ainsi un mélange d'oligosaccharides (III).

Le mélange d'oligosaccharides (III) obtenu est ensuite chromatographié selon la méthode suivante : La chromatographie s'effectue sur des colonnes remplies avec du gel polyacrylamide-agarose connu sous la dénomination Ultrogel ACA 202 et le
20 mélange est élué par une solution contenant un tampon phosphate (0,02 mol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) $\text{pH} = 7$ et 0,1 mol/l de chlorure de sodium. La détection est réalisée en spectrométrie UV (254 nm) et ionique (IBF). Les produits peuvent être éventuellement purifiés par chromatographie SAX (strong anion exchange) ou par précipitation fractionnée selon la méthode décrite dans le brevet FR 2548672. Les
25 fractions de produit récupéré sont lyophilisées puis désalées sur une colonne remplie de gel sephadex G10^R (Pharmacia Biochemicals).

Par cette méthode, on obtient 3 g de disaccharide Is, 1100 mg d'un mélange d'hexasaccharide contenant typiquement 55 % de dérivé DIs-Is-Is, 35 % de DIs-Is-IIIs et 10 % de DIs-Is-IIIs. Ce dernier mélange peut être purifié selon les méthodes connues de l'homme du métier pour en séparer chacun des constituants ou utilisé tel
5 quel pour la transformation en dérivés réduits de formule (I).

EXEMPLE B - préparation des oligosaccharides de formule (II) pour lesquels $n=0, 1, 2, 3$ ou 4 par dépolymérisation de l'ester benzylique d'héparine et séparation

a - Préparation de l'ester benzylique de l'héparine

L'ester benzylique de l'héparine est préparé selon l'exemple 3 du brevet US 5,389,618.

10 b- Dépolymérisation

Dissoudre 100 g d'ester benzylique de l'héparine dans 1,9 l d'eau déminéralisée. Le mélange est porté à 60°C sous agitation. Après l'obtention d'une solution homogène, on introduit en une seule fois environ 35 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 23 %. Après 10 minutes de réaction, la solution est ensuite refroidie et neutralisée par
15 80 ml d'une solution d'acide acétique environ 2 N. A cette solution, on ajoute 10 % en poids/volume d'acétate de sodium. Le mélange d'oligosaccharides est précipité par addition d'environ 2 volumes de méthanol. Le précipité est isolé par filtration, lavé au méthanol à deux reprises puis séché sous pression réduite à 50°C. Après séchage, on obtient 73,8 g d'un mélange d'oligosaccharides (II).

20 c- Enrichissement en oligosaccharide pour lequel $n = 1$

Dissoudre 30 g du mélange d'oligosaccharides obtenu précédemment dans environ 35 volumes d'eau. Cette solution est ultrafiltrée sur membrane 3 kDa (Pellicon). Lorsque 600 ml de perméat ont été soutirés, on dilue le rétentat par 500 ml d'eau. L'opération est poursuivie jusqu'à soutirement de 450 ml de perméat supplémentaires. Les deux
25 fractions de perméat sont réunies puis concentrées à sec sous pression réduite. On obtient 6,1 g d'un solide blanc jaunâtre. L'analyse du solide par chromatographie de

perméation sur gel indique qu'il contient environ 30 % d'oligosaccharide de formule (II) pour lequel $n=1$.

d - Fractionnement des mélanges d'oligosaccharides ultrafiltrés

Le mélange enrichi est fractionné sur des colonnes remplies avec du gel polyacrylamide-agarose connu sous la dénomination Ultrogel ACA 202 (on utilise 4 colonnes en série d'un diamètre de 10 cm et d'une hauteur de 50 cm). 5 g du mélange enrichi par ultrafiltration sont dissous dans 25 ml d'eau puis élués par une solution 0,2 mol/l de chlorure de sodium à la vitesse de 5 ml/min. On recueille en bas de colonne des fractions de 25 ml. La détection des produits est réalisée en spectrométrie UV (254 nm) et ionique (IBF). Les fractions de produit pour lequel $n = 1$ sont récupérées, lyophilisées puis désalées sur une colonne remplie de gel Sephadex G10. Après lyophilisation, on obtient 1g de tétrasaccharide contenant typiquement 70 % de dérivé DIs-Is de formule II ($R_1, R_2, R_3, R_5, R_7, R_8 = SO_3Na$; $R_4, R_6 = H$ et $M = Na$). Le dérivé DIs-Is peut être éventuellement purifié par chromatographie SAX (strong anion exchange) ou selon un aspect préférentiel par précipitation fractionnée selon la méthode décrite dans le brevet FR 2548672 et la variante décrite dans la présente invention.

EXEMPLES DE PREPARATION DES OLIGOSACCHARIDES DE FORMULE (I)

EXEMPLE 1

Dans un réacteur on introduit une solution à 25°C de 300 mg d'un oligosaccharide de formule (II) dans laquelle n est égal à 0, R_1, R_7 et R_8 représentent un radical SO_3M , R_6 représente un atome d'hydrogène et M est sodium, dans 2 ml d'eau. Sous agitation, on ajoute en une fois 212 mg de borohydrure de sodium. Le pH est alors ajusté entre 9 et 10 par addition d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 12 heures, on ajoute de façon progressive de l'acide acétique jusqu'à obtention d'un pH compris entre 4 et 5. Le mélange est agité 1 heure puis on réajuste le pH à 6,7 par addition de soude à 0,5 mol/l. Le mélange est alors concentré à sec à 50°C sous pression réduite.

Le concentrât est dispersé sous agitation magnétique dans 10 ml de méthanol. Après une nuit de sédimentation, la suspension est filtrée sur membrane Whatman GF/B. Le solide sur filtre est dissous par passage de 2 portions de 10 ml d'eau distillée. Cette solution est alors concentrée à sec à 50°C sous pression réduite. On obtient 580 mg d'un solide blanc. Le solide est ensuite dispersé sous agitation magnétique dans 15 ml de méthanol. Après 30 minutes d'agitation, la suspension est filtrée sur membrane Whatman GF/B. Le gâteau est dissous par passage de 2 portions de 10 ml d'eau distillée. La solution obtenue est concentrée à sec à 50°C sous pression réduite. On obtient ainsi 250 mg d'un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 0, R_1 , R_7 et R_8 représentent un radical SO_3M , R_6 représente un atome d'hydrogène et M est sodium, sous la forme d'un mélange des diastéréoisomères. On note de I à II les sucres constitutifs des disaccharides, I étant le résidu réduit et II le résidu acide uronique insaturé [(acide 4-déoxy-2-*O*-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino-D-glucitol, sel de tétrasodium); (acide 4-déoxy-2-*O*-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino-D-manitol, sel de tétrasodium) : Spectre proton dans D_2O , 600MHz, $T=305K$, δ en ppm: 3,38 (1H, m, $H-2^{(I)}$), 3,70 et 3,75 (1H chacun, respectivement dd, $J=6$ et 12Hz et dd, $J=5$ et 12Hz, $2H-1^{(II)}$), 3,86 (1H, t, $J=5Hz$, $H-3^{(II)}$), 4,13 (1H, dd, $J=8$ et 11Hz, $H-6^{(II)}$), 4,18 (1H, m, $H-4^{(II)}$), 4,25 (2H, m, $H-6^{(II)}$ et $H-3^{(III)}$), 4,35 (1H, m, $H-5^{(II)}$), 4,65 (1H, m, $H-2^{(III)}$), 5,67 (1H, s, $H-1^{(III)}$), 6,00 (1H, d, $J=5Hz$, $H-4^{(III)}$)].

EXEMPLE 2

Dans un réacteur on introduit une solution à 25°C de 60 mg d'un oligosaccharide de formule (II) dans laquelle n est égal à 1, R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_7 et R_8 représentent un radical SO_3M , R_4 et R_6 représentent un atome d'hydrogène et M est sodium, dans 1,2 ml d'eau. Sous agitation, on ajoute en une fois 18 mg de borohydrure de sodium. Le pH est alors ajusté entre 9 et 10 par addition d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 12 heures, on ajoute de façon progressive de l'acide acétique jusqu'à obtention d'un pH compris entre 4 et 5. Le mélange est agité 1 heure puis on ajoute 5 ml de méthanol. La suspension est filtrée sur membrane Whatman GF/B et le

solide récupéré est rincé par 2 fois 0,5 ml de méthanol. Après séchage, on obtient 42 mg d'un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 1, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium, sous forme d'un mélange des diastéréoisomères. On note de I à IV les

5 sucres constitutifs des tétrasaccharides, I étant le résidu réduit et IV le résidu acide uronique insaturé [(acide 4-déoxy-2-O-sulfo-a-L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique-(1→4)-2-déoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino-a-D-glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-O-sulfo-a-L-idopyranosyluronique -(1→4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo-D-glucitol, sel d'octasodium) ; (acide 4-déoxy-2-O-sulfo-a-L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique-

10 (1→4)-2-déoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino-a-D-glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-O-sulfo-a-L-idopyranosyluronique -(1→4)-2-déoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino-D-manitol, sel d'octasodium) : Spectre proton dans D₂O, 400MHz, T=298K, δ en ppm: 3,25 (1H, dd, J=10 et 3Hz, H-2^(III)), 3,37 (1H, m, H-2^(I)), 3,59 (1H, m, H-3^(III)), 3,75 (2H, m, 2H-1^(I)), 3,79 (1H, t, J=9Hz, H-4^(III)), 3,86 (1H, m, H-3^(I)), entre 4,05 et 4,40 (10H, massif, H-4^(I)/H-5^(I)/2H-6^(I), H-2^(III)/H-3^(II)/H-4^(II)), 2H-6^(III), H-3^(IV)), 4,58 (1H, m, H-2^(IV)), 4,60

15 (1H, m, H-5^(III)), 5,27 (1H, d, J=4Hz, H-1^(III)), 5,42 (1H, d, J=4Hz, H-1^(III)), 5,47 (1H, d, J=2Hz, H-1^(IV)), 5,95 (1H, d, J=5Hz, H-4^(IV)).

EXEMPLE 3

Dans un réacteur on introduit une solution à 25°C de 100 mg d'un oligosaccharide de

20 formule (II) dans laquelle n est égal à 2, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium, dans 2 ml d'eau. Sous agitation, on ajoute en une fois 20 mg de borohydrure de sodium. Le pH est alors ajusté entre 9 et 10 par addition d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 12 heures, on ajoute de façon progressive de l'acide acétique jusqu'à

25 obtention d'un pH compris entre 4 et 5. Le mélange est agité 1 heure puis on réajuste le pH à 6,7 par addition de soude à 0,5 mol/l. Le mélange est alors dilué avec de l'eau distillée en quantité suffisante pour obtenir 20 ml. On ajoute 2,5 g d'acétate de sodium et on coule 3 volumes de méthanol. La suspension est filtrée sur membrane Whatman GF/B et le solide récupéré est rincé par 2 fois 2 ml de méthanol. Après

séchage, on obtient 61 mg d'un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 2, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium, sous forme d'un mélange des diastéréoisomères. On note de I à VI les sucres constitutifs des hexasaccharides, I étant le résidu réduit et

5 VI le résidu acide uronique insaturé. [(acide 4-déoxy-2-O-sulfo-a-L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique -(1→4)- 2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo-a-D-glucopyranosyl-(1→4)- acide 2-O-sulfo-a-L-idopyranosyluronique -(1→4)- 2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo-a-D-glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-O-sulfo-a-L-idopyranosyluronique-(1→4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo-D-glucitol, sel de dodécasodium) ; (acide 4-

10 déoxy-2-O-sulfo-a-L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique -(1→4)- 2-déoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino-a-D-glucopyranosyl-(1→4)- acide 2-O-sulfo-a-L-idopyranosyluronique -(1→4)- 2-déoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino-a-D-glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-O-sulfo-a-L-idopyranosyluronique-(1→4)-2-déoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino-D-manitol, sel de dodécasodium) : Spectre proton dans D₂O, 600MHz, T=305K, δ en ppm: 3,25 (2H, m, H-2^(III) et ^(V)), 3,38 (1H, m, H-2^(I)), 3,61 (2H, t, J=10Hz, H-3^(III) et ^(V)), entre 3,70 et 3,83 (4H, massif, 2H-1^(I) et H-4^(III) et ^(V)), 3,86 (1H, t, J=5Hz, H-3^(II)), 4,00 (2H, m, H-5^(III) et ^(V)), 4,07 (1H, m, H-4^(IV)), 4,08 (1H, m, H-4^(I)), entre 4,10 et 4,45 (13H, massif, H-5^(II)/2H-6^(II), H-2^(II)/H-3^(II)/H-4^(II), 2H-6^(III), H-2^(IV)/H-3^(IV), 2H-6^(V), H-3^(VI)), 4,60 (1H, s, H-2^(VI)), 4,62 (1H, s, H-5^(III)), 4,78 (1H, s, H-5^(IV)), 5,17 (1H, s, H-1^(IV)), 5,28 (1H, d, J=4Hz, H-1^(II)), 5,38 (1H, d, J=3Hz, H-1^(V)), 5,44 (1H, d, J=3Hz, H-1^(III)), 5,47 (1H, d, J=2Hz, H-1^(VI)), 5,96 (1H, d, J=5Hz, H-4^(VI))].

20

EXEMPLE 4

Dans un réacteur on introduit une solution à 25°C de 100 mg d'un oligosaccharide de formule (II) dans laquelle n est égal à 3, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium, dans 2 ml

25 d'eau. Sous agitation, on ajoute en deux fois 30 mg de borohydrure de sodium. Le pH est alors ajusté entre 9 et 10 par addition d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 12 heures, on ajoute de façon progressive de l'acide acétique jusqu'à obtention d'un pH compris entre 4 et 5. Le mélange est agité 1 heure puis on réajuste

le pH à 6,7 par addition de soude à 0,5 mol/l. Le mélange est alors dilué avec de l'eau distillée en quantité suffisante pour obtenir 20 ml. On ajoute 2 g d'acétate de sodium et on coule 3 volumes de méthanol. La suspension est filtrée sur membrane Whatman GF/B et le solide récupéré est rincé par 2 fois 1 ml de méthanol. Après séchage, on obtient 68 mg d'un solide blanc. Après contrôle CLHP (Chromatographie Liquide Haute Pression), le produit n'étant pas totalement réduit, on renouvelle de façon complète les toutes opérations précédentes. Après séchage, on obtient 45 mg d'un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 3, R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_7 et R_8 représentent un radical SO_3M , R_4 et R_6 représentent un atome d'hydrogène et M est sodium, sous forme d'un mélange des diastéréoisomères. On note de I à VIII les sucres constitutifs des octasaccharides, I étant le résidu réduit et VIII le résidu acide uronique insaturé, [(acide 4-déoxy-2-*O*-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique - (1 \rightarrow 4)- 2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- acide 2-*O*-sulfo- α -L-idopyranosyluronique -(1 \rightarrow 4)- 2-déoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- acide 2-*O*-sulfo- α -L-idopyranosyluronique -(1 \rightarrow 4)- 2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- acide 2-*O*-sulfo- α -L-idopyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino-D-glucitol, sel d'hexadécasodium) ; (acide 4-déoxy-2-*O*-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique -(1 \rightarrow 4)- 2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- acide 2-*O*-sulfo- α -L-idopyranosyluronique -(1 \rightarrow 4)- 2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- acide 2-*O*-sulfo- α -L-idopyranosyluronique -(1 \rightarrow 4)- 2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- acide 2-*O*-sulfo- α -L-idopyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino-D-manitol, sel d'hexadécasodium) : Spectre proton dans D_2O , 600MHz, $T=305K$, δ en ppm: 3,25 (3H, m, $H-2^{(III)}$, $H-2^{(V)}$, $H-2^{(VII)}$), 3,38 (1H, m, $H-2^{(I)}$), 3,61 (3H, m, $H-3^{(III)}$, $H-3^{(V)}$, $H-3^{(VII)}$), entre 3,70 et 3,83 (5H, massif, $2H-1^{(I)}$ et $H-4^{(III)}$, $H-4^{(V)}$, $H-4^{(VII)}$), 3,86 (1H, t, $J=5Hz$, $H-3^{(I)}$), 4,00 (3H, m, $H-5^{(III)}$, $H-5^{(V)}$, $H-5^{(VII)}$), 4,08 (3H, m, $H-4^{(I)}$, $H-4^{(IV)}$, $H-4^{(VI)}$), entre 4,10 et 4,45 (17H, massif, $H-5^{(I)}/2H-6^{(I)}$, $H-2^{(II)}/H-3^{(II)}/H-4^{(II)}$, $2H-6^{(III)}$, $H-2^{(IV)}/H-3^{(IV)}$, $2H-6^{(V)}$, $H-2^{(VI)}/H-3^{(VI)}$, $2H-6^{(VII)}$, $H-3^{(VIII)}$), 4,59 (1H, s, $H-2^{(VIII)}$), 4,62 (1H, s, $H-5^{(III)}$), 4,78 (2H, s, $H-5^{(IV)}$, $H-5^{(VI)}$), 5,17 (2H, s, $H-1^{(IV)}$, $H-1^{(VI)}$), 5,28

EXAMPLE 5

BNSDOCID: <FR 2807043A1 | >

glucopyranosyl-(1→4)- acide 2-*O*-sulfo- α -L-idopyranosyluronique -(1→4)- 2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranosyl-(1→4)- acide 2-*O*-sulfo- α -L-idopyranosyluronique-(1→4)-2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino-D-manitol, sel

- d'eicosodium) : Spectre proton dans D₂O, 600MHz, T=303K, δ en ppm: 3,23 (4H, m, H-2^(III), H-2^(V), H-2^(VII), H-2^(IX)), 3,35 (1H, m, H-2^(I)), 3,59 (4H, m, H-3^(III), H-3^(V), H-3^(VII), H-3^(IX)), entre 3,65 et 3,80 (6H, m), 3,85 (1H, m, H-3^(I)), entre 3,90 et 4,40 (29H, m), 4,57 (1H, m, H-2^(X)), 4,59 (1H, m, H-5^(III)), 4,75 (3H, m, H-5^(IV), H-5^(VI), H-5^(VIII)), 5,15 (3H, m, H-1^(IV), H-1^(VI), H-1^(VIII)), 5,25 (1H, m, H-1^(III)), 5,37 (3H, m, H-1^(V), H-1^(VII), H-1^(IX)), 5,42 (1H, m, H-1^(III)), 5,45 (1H, m, H-1^(X)), 5,93 (1H, d, J=5Hz, H-4^(X)).

- Les médicaments selon l'invention comprennent en tant que principe actif au moins un oligosaccharide de formule (I) ou un mélange d'oligosaccharides de formule (I), sous forme d'une composition dans laquelle il est associé à tout autre produit pharmaceutiquement compatible, pouvant être inerte ou physiologiquement actif. Les médicaments selon l'invention peuvent être employés par voie intraveineuse, sous-cutanée, orale, rectale, topique ou pulmonaire (inhalation).

- Les compositions stériles pour administration intraveineuse ou sous-cutanée, sont généralement des solutions aqueuses. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en particulier des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants, dispersants et stabilisants. La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple par filtration aseptisante, en incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation. Elles peuvent également être préparées sous forme de compositions solides stériles qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans de l'eau stérile ou tout autre milieu stérile injectable.

- Comme compositions solides pour administration orale, peuvent être utilisés des comprimés, des pilules, des poudres (capsules de gélatine, cachets) ou des granulés. Dans ces compositions, le principe actif est mélangé à un ou plusieurs diluants inertes, tels que amidon, cellulose, saccharose, lactose ou silice, sous courant d'argon.

Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres que les diluants, par exemple un ou plusieurs lubrifiants tels que le stéarate de magnésium ou le talc, un agent favorisant l'absorption orale, un colorant, un enrobage (dragées) ou un vernis.

- 5 Comme compositions liquides pour administration orale, on peut utiliser des solutions, des suspensions, des émulsions, des sirops et des élixirs pharmaceutiquement acceptables contenant des diluants inertes tels que l'eau, l'éthanol, le glycérol, les huiles végétales ou l'huile de paraffine. Ces compositions peuvent comprendre des substances autres que les diluants, par exemple des produits
- 10 mouillants, édulcorants, épaississants, aromatisants ou stabilisants.

Les compositions pour administration rectale sont les suppositoires ou les capsules rectales qui contiennent, outre le produit actif, des excipients tels que le beurre de cacao, des glycérides semi-synthétiques ou des polyéthylèneglycols.

- Les compositions pour administration topique peuvent être par exemple des crèmes,
- 15 lotions, collyres, collutoires, gouttes nasales ou aérosols.

Les doses dépendent de l'effet recherché, de la durée du traitement et de la voie d'administration utilisée; elles sont généralement comprises entre 0,5 mg et 10 mg par kg par jour par voie sous-cutanée soit 3 à 60 mg par jour pour un adulte de 60 kg.

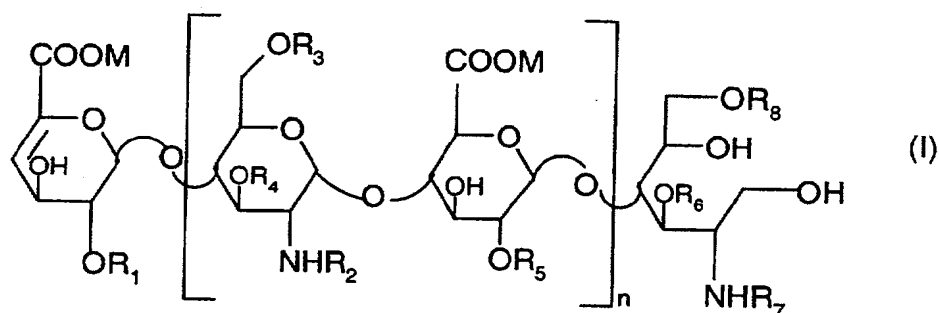
- D'une façon générale, le médecin déterminera la posologie appropriée en fonction de
- 20 l'âge, du poids et de tous les autres facteurs propres au sujet à traiter.

- L'invention concerne également la méthode de prévention ou de traitement de maladies liées à un processus inflammatoire impliquant la production de substances cytotoxiques telle que le nitrite oxyde (NO). Les oligosaccharides de formule (I) peuvent ainsi être utilisées pour la prévention et/ou le traitement des maladies
- 25 neurodégénératives pour lesquelles l'inflammation cérébrale joue un rôle délétère pouvant conduire à la mort parmi lesquelles on peut citer les ischémies cérébrales, les ischémies cardiaques (infarctus du myocarde), les ischémies périphériques, les

- traumatismes du système nerveux central et notamment les traumatismes crâniens, spinaux et cranio-spinaux, la sclérose en plaques, les douleurs neuropathiques et les neuropathies périphériques, les maladies du motoneurone dont la sclérose latérale amyotrophique, le neuro-sida, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la
- 5 Chorée de Huntington et certaines formes d'ostéoarthrites notamment à localisation articulaire.

REVENDICATIONS

1 - Composition pharmaceutique contenant en tant que principe actif un oligosaccharide de formule :



- 5 dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R_1 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et R_8 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M , R_2 et R_7 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M ou COCH_3 et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium ou un mélange de ces oligosaccharides.
- 10 2 - Composition pharmaceutique selon la revendication 1 contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel R_4 et R_6 représentent un atome d'hydrogène ou un mélange de ces oligosaccharides.
- 3 - Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 ou 2 contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est un entier de 0 à 10, un mélange de ces
- 15 oligosaccharides.
- 4 - Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 ou 2 contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est un entier de 0 à 6, un mélange de ces oligosaccharides.
- 5 - Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 ou 2 contenant un
- 20 oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est un entier de 1 à 6, un mélange de ces oligosaccharides.

6 - Composition pharmaceutique selon la revendication 1 contenant un oligosaccharide choisi parmi les oligosaccharides de formule (I) suivants :

- n est égal à 0, R_1 , R_7 et R_8 représentent un radical SO_3M , R_6 représente un atome hydrogène et M est sodium,

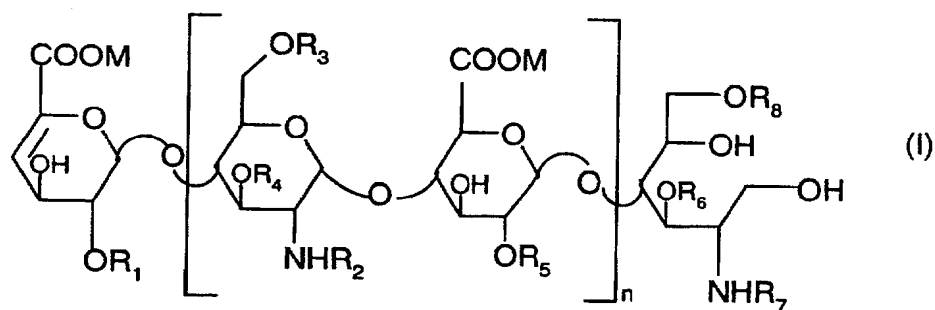
5 - n est égal à 1, R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_7 et R_8 , représentent un radical SO_3M , R_4 et R_6 représentent un atome d'hydrogène et M est sodium,

- n est égal à 2, R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_7 et R_8 , représentent un radical SO_3M , R_4 et R_6 représentent un atome d'hydrogène et M est sodium,

10 - n est égal à 3, R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_7 et R_8 , représentent un radical SO_3M , R_4 et R_6 représentent un atome d'hydrogène et M est sodium,

- n est égal à 4, R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_7 et R_8 , représentent un radical SO_3M , R_4 et R_6 représentent un atome d'hydrogène et M est sodium.

7 - Oligosaccharide de formule :



15 dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R_1 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et R_8 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M , R_2 et R_7 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M ou $COCH_3$ et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium, à l'exception de ceux pour lesquels n est égal à 0 et soit R_1 , R_6 et R_8 sont des atomes d'hydrogène et R_7

20 représente un radical SO_3M ou $COCH_3$ et M est sodium, soit R_1 et R_6 représentent un

atome d'hydrogène, R_7 représente un radical COCH_3 , R_8 représente un radical SO_3M et M est sodium, soit R_6 représente un hydrogène et R_1 , R_7 et R_8 représentent un radical SO_3M et M est sodium.

8 - Oligosaccharide de formule (I) selon la revendication 7 pour lequel R_4 et R_6
5 représentent un atome d'hydrogène.

9 - Oligosaccharide de formule (I) selon l'une des revendications 7 ou 8 pour lequel n est un entier de 0 à 10.

10 - Oligosaccharide de formule (I) selon l'une des revendications 7 ou 8 pour lequel n est un entier de 0 à 6.

10 11 - Oligosaccharide de formule (I) selon l'une des revendications 7 ou 8 pour lequel n est un entier de 1 à 6.

12 - Oligosaccharide de formule (I) selon la revendication 7 choisi parmi les oligosaccharides suivants :

- n est égal à 0, R_1 , R_7 et R_8 représentent un radical SO_3M , R_6 représente un atome
15 hydrogène et M est sodium,

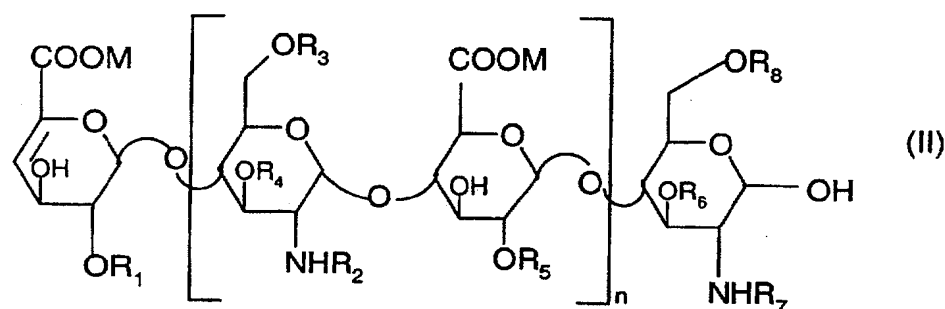
- n est égal à 1, R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_7 et R_8 , représentent un radical SO_3M , R_4 et R_6 représentent un atome d'hydrogène et M est sodium,

- n est égal à 2, R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_7 et R_8 , représentent un radical SO_3M , R_4 et R_6 représentent un atome d'hydrogène et M est sodium,

20 - n est égal à 3, R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_7 et R_8 , représentent un radical SO_3M , R_4 et R_6 représentent un atome d'hydrogène et M est sodium,

- n est égal à 4, R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_7 et R_8 , représentent un radical SO_3M , R_4 et R_6 représentent un atome d'hydrogène et M est sodium.

13 - Procédé de préparation des oligosaccharides de formule (I) selon la revendication 7 caractérisé en ce que l'on fait réagir un borohydrure de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire sur des oligosaccharides de formule :



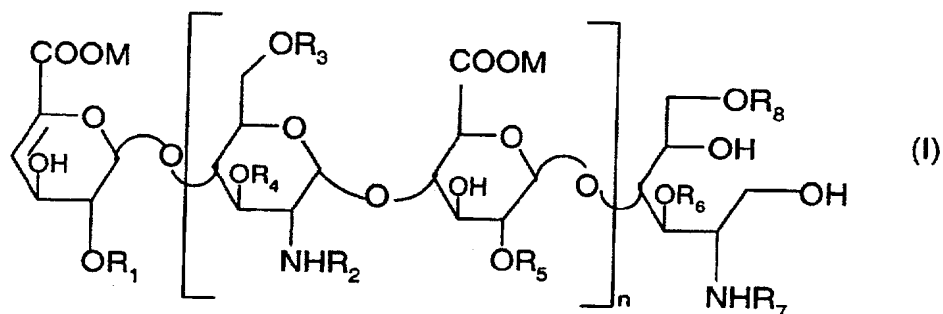
5 dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R_1 , R_3 , R_4 et R_5 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M , R_2 et R_6 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M ou COCH_3 et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium et isole les oligosaccharides.

14 - Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que l'on effectue la réaction
10 en milieu aqueux, à une température voisine de 25°C et à un pH de 7 à 10.

15 - Procédé selon l'une des revendications 13 et 14 caractérisé en ce que le pH réactionnel est de 9 à 10.

16 - Procédé selon des revendications 13 à 15 caractérisé en ce que le borohydrure de
15 métal alcalin ou d'ammonium quaternaire est le borohydrure de lithium, sodium, de potassium ou de tétrabutylammonium.

17 - Utilisation des oligosaccharides de formule :



dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R_1 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et R_8 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M , R_2 et R_7 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M ou COCH_3 et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium ou un mélange de ces oligosaccharides pour la préparation d'un médicament utile pour la prévention ou le traitement de maladies liées à un processus inflammatoire impliquant la production de nitrite oxyde (NO).

18 - Utilisation des oligosaccharides de formule (I) selon la revendication 17 pour la préparation de médicaments utiles pour la prévention et le traitement des ischémies cérébrales, cardiaques ou vasculaires périphériques, d'ostéoarthrites, des traumatismes du système nerveux central, des traumatismes crâniens, spinaux et cranio-spinaux, de la sclérose en plaques, des douleurs neuropathiques et des neuropathies périphériques, des maladies du motoneurone, de la sclérose latérale amyotrophique, du neuro-sida, de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson et de la Chorée de Huntington.



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 588201
FR 0003910

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	US 5 449 688 A (WAHL SHARON M ET AL) 12 septembre 1995 (1995-09-12) * abrégé *	1,17	C07H13/12 A61K31/737 A61P9/00 A61P25/00 A61P31/00
X	MCLEAN, MAITLAND W. ET AL: "Flavobacterium heparinum 2-0-sulfatase for 2-0-sulfato-.DELTA.4,5- glycuronate-terminated oligosaccharides from heparin" EUR. J. BIOCHEM. (1984), 145(3), 607-15 , XP000974364 page 612, structures C et D	7-10, 13-16	
A,D	LEE, GEORGE JIA-LONG ET AL: "Separation of reduced disaccharides derived from glycosaminoglycans by high-performance liquid chromatography" J. CHROMATOGR. (1981), 212(1), 65-73 , XP000867181 * page 67 *	7,13	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			C07H C08B A61K A61P
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
21 décembre 2000		de Nooy, A	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>			